

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：17K10492
研究課題名（和文）低線量照射における放射線超感受性を用いた低侵襲がん治療戦略の開発-膠芽腫での検討

研究課題名（英文）Minimally invasive cancer treatment strategy using hyper-radiosensitivity in low-dose repeat irradiation - a Glioblastoma study

研究代表者
深田 淳一（Fukada, Junichi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：50338159
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：難治性の悪性腫瘍である膠芽腫に対する治療法として低線量照射における放射線超感受性に着眼した。膠芽腫細胞に対する低線量照射のインターバルとして30分間隔が反応良好であった。その原因として照射後の細胞周期を経時的に観察したところ、約5時間程度で変化が著明であった。反復照射中に放射線感受性の高い細胞周期への移動を生じていることが反応良好である理由であり、反復照射が有効な治療法と結論付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫が治療抵抗性であることから放射線超感受性に着目した抗腫瘍効果の増強を探索する試みは重要と考える。また再発時に再度放射線療法が期待されることから低線量放射線照射に関する研究は重要である。放射線増感剤の探索、遺伝子解析を用いた放射線超感受性の機序解明を進めることで、放射線生物学的にも重要な研究と考えている。
本研究を進展させ、臨床応用可能な低線量反復照射を提案できれば、照射線量を低減した治療が実現可能となる。これは、正常組織の有害事象低減のみならず、患者さん、医療従事者の負担軽減にもつながり、難治性とされてきた膠芽腫に対する新しい治療戦略を提示する意義深い研究であると考えている。

研究成果の概要（英文）：We focused on hyper-radiosensitivity at low dose irradiation as a treatment for glioblastoma, a refractory malignant tumor. Thirty-minute intervals showed a good response for a low-dose irradiation interval compared to other shorter intervals in several malignant glioma cell lines. We performed cell cycle observation after irradiation at several time course. The change was not significant in 30 minutes and 3hours but remarkable in about 5 hours. The most prominent foci fluorescence due to DNA damage repair was observed in the cells collected 30 minutes after irradiation but the difference in foci number between single and repeated irradiation was unclear. It was difficult to sort M-phase cells by the shake-off method. The cell ratio of M phase by irradiation was measured by immunostaining. We conclude that repeated irradiation is an effective treatment because the reaction is good because it causes migration to the cell cycle that is radiosensitive during repeated irradiation.

研究分野：放射線治療

キーワード：Glioma 放射線感受性 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は成人の原発性脳腫瘍の中で最も頻度の高い疾患である。手術、放射線、抗がん剤による集学的治療が標準治療として行われているが、局所再発率は高く予後不良である。放射線感受性が低いことが局所制御不良の一因であり、高線量投与を行うことで局所制御が改善するという報告もあるが、脳実質の壊死のリスクが高まり、その一方播種による再発を来す症例も多く、依然として難治性である。正常組織に投与可能な線量には制限があり、かつ放射線照射による正常組織の被ばくが避けがたいという困難な条件において治療成績を向上させるため、低線量照射における腫瘍細胞の放射線超感受性を利用することを着想した。これまで放射線生物学における基礎研究にて、線形二次(LQ)モデル[linear-quadratic model]上で、1.0Gy未滿の低線量照射時における細胞生存率は2-6Gy程度の照射時より急峻な傾きを持って低下しており、放射線感受性が高い(放射線超感受性)と報告されている(Short S, *Int J Radiat Biol* 1999)。申請者はこれまで、膠芽腫細胞に対し低線量照射を行い細胞応答について測定し、放射線超感受性を示す機序の解明を進めると同時に低線量照射の反復投与である『低線量反復照射』を行い臨床応用可能な治療法の開発を進めてきた。低線量反復照射については、照射間隔が比較的長い照射間隔30分の条件で生残率の低下が見られたが、細胞周期比率の変化、アポトーシス分画の増加はわずかであり、生残率低下の理由が明らかにできなかった。

2. 研究の目的

本研究の目標は低線量照射における放射線超感受性を用いた新たな低侵襲がん治療戦略の開発である。これを実現させるため以下を研究目的とした。放射線超感受性が顕著とされているG2/M期の細胞周期にある細胞を集め、様々な条件の低線量照射、低線量反復照射及び通常線量照射を行い、細胞応答を測定し、低線量照射の有効性を検討する、細胞周期をG2/M期に誘導する薬剤と低線量反復照射の併用による細胞応答を測定することで、臨床応用可能な放射線増感剤を見出す、まだ明らかになっていない放射線超感受性の機序について遺伝子解析を用いて解明する。

3. 研究の方法

(1) 代表的なヒト膠芽腫細胞系のなかから使用する培養細胞株を複数選択し、照射間隔(0-30分)を変じて低線量反復照射(20cG \times 10回)を行い、細胞応答(生存率、細胞周期、DNA損傷、アポトーシス分画等)を測定する。生存率はコロニー形成法、トリパンブルー染色等の複数の方法で確認する。DNA損傷については、H2AX抗体を用いた免疫染色及びフローサイトメトリー法で解析する。アポトーシス分画はフローサイトメトリーを用いて測定する。

(2) 細胞周期はフローサイトメトリーを用いて測定する。経時的変化についても検討を加える。

(3) 細胞同調(G2/M期)については、M期の細胞が形態上培地との接着が弱くなっていることを利用し、鏡見しながらM期シェイクオフ法で行う。その他の方法として薬剤の処理による同調が可能であるが、細胞への影響が少ない方法から試みる。

(4) 細胞同調により放射線感受性が高くなることを確認したのち、細胞周期をG2/M期に誘導する薬剤と低線量反復照射を併用し、細胞応答を観察する。

4. 研究成果

(1) ヒト膠芽腫細胞系 膠芽腫細胞系（全細胞周期） G2-M 期同調に対する照射間隔（0-30 分）を変じた低線量反復照射（20cG × 10 回）と細胞生存率。

ヒト膠芽腫細胞系として U251, LN229, LN428, U87 を選択したのち照射によるコロニー形成法を行った。生存率を測定したところ、照射間隔が長くなるにつれて生存率が低下することを確認した。一例として U87 における形成率は、2 Gy 単回照射時を 100% とすると、1 分間隔、3 分間隔、10 分間隔、30 分間隔で 100、91、88、85、69% であった。次にアネキシン V 抗体で染色してアポトーシス分画の検出をフローサイトメトリーで測定した。30 分間隔の照射後、30 分の回収で 5% 程度のアポトーシス分画増加が見られたが他は変化がはっきりしなかった。そこで照射による差が明らかになるかを G2-M 期同調で確認するためシェイクオフ法を行った。

(2) 細胞周期の観察

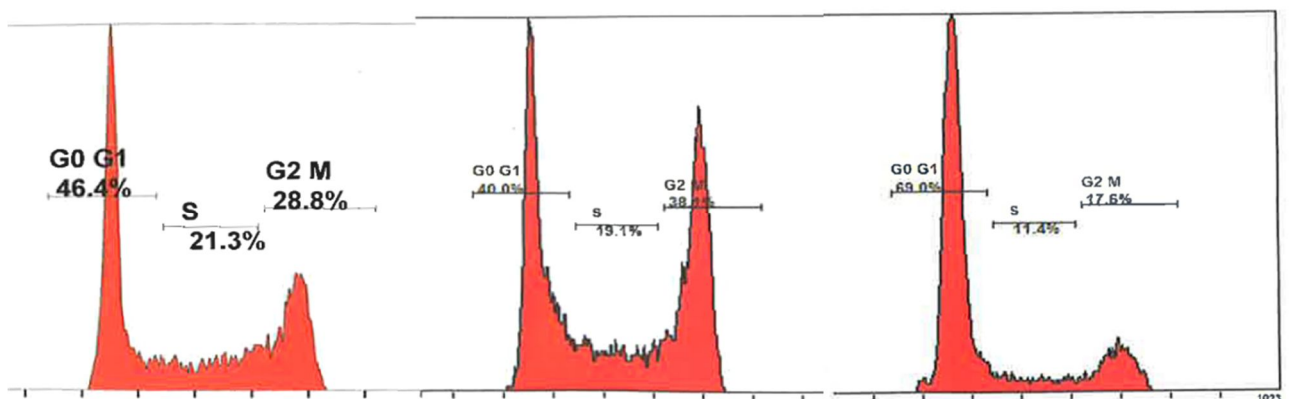
当初は照射終了後 30 分、24 時間、48 時間で生存率を測定したが差がそれほど顕著に検出できなかった。そこで照射間隔 0 分（単回照射）と 30 分間隔による低線量反復照射（20cG × 10 回）に条件を絞りこみ、照射後の細胞周期の変化について照射後の時間経過をより詳細に追跡した。生存率はトリパンプルー染色法、細胞周期は PI 染色により DNA 量を測定するほか、M 期を特定できるヒストン H3 抗体染色を追加してフローサイトメトリーを用いて測定した。照射終了直後と 1 日後では細胞周期に明らかな差を観察できなかったが、時間スケールを増加することで G2/M 期の増加が観察された。これは、単回照射と低線量反復照射いずれでも観察され、複数の膠芽腫細胞系（U251、LN428、LN229）でも同様の反応があることが確認された。

低線量反復照射後の細胞周期の経時的変化

低線量反復照射後 30 分（左）と照射後 24 時間（右）では G2/M 期の増加は見られないが、照射後 5 時間（中央）では G2/M 期分画の明らかな増加を認めた。

M 期は 0.5-4% の範囲であり大きな変化は見られなかった。

シェイクオフ法での細胞分取を行ったが死細胞の混入が避けられず M 期分画の明らかな増加は得られなかった。

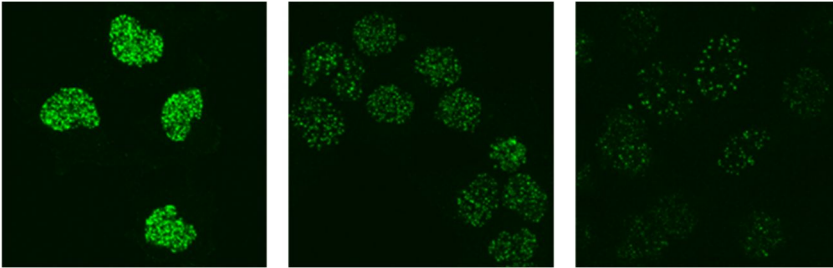


(3) アポトーシス分画の変化が顕著にみられなかったため、低線量反復照射後の経時的な DNA 損傷について、30 分、5 時間、12 時間、24 時間後に細胞を回収し、H2AX 抗体を用いた免疫染

色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。

照射後 30 分で回収した細胞 (左下) で最も顕著な foci の蛍光が観察された。単回照射と反復照射における foci 数の差ははっきりせず同様の傾向と考えられた。

【 H2AX 抗体を用いた免疫染色】照射終了後 30 分 (左) 5 時間 (中) 24 時間 (右)



(4)まとめ

低線量反復照射においては 30 分間隔が治療効果として有効と考えられた。照射開始後 5 時間では細胞周期の変化が著明に生じており、放射線感受性の高い G2/M 期での照射が行われていることが一因であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yura Masahiro, Takahashi Tsunehiro, Fukuda Kazumasa, Nakamura Rieko, Wada Norihito, Fukada Junichi, Kawakubo Hirofumi, Takeuchi Hiroya, Shigematsu Naoyuki, Kitagawa Yuko	4. 巻 12
2. 論文標題 A Highly Advanced Gastric Cancer Maintaining a Clinical Complete Response after Chemoradiotherapy Comprising S-1 and Cisplatin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Case Reports in Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 578 ~ 585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000492206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakahara Tadaki, Owaki Yoshiki, Kosaka Takeo, Fukada Junichi, Ichimura Akira, Jinzaki Masahiro	4. 巻 43
2. 論文標題 Fatal Intracranial Hemorrhage Due to Thrombocytopenia in a Patient With Castration-Resistant Prostate Cancer Showing Extensive Bone Uptake of Injected 223Ra Dichloride	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Nuclear Medicine	6. 最初と最後の頁 546 ~ 547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/RLU.0000000000002117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito Shin, Ozawa Hiroyuki, Ikari Yuuichi, Nakahara Nana, Ito Fumihiro, Sekimizu Mariko, Fukada Junichi, Kameyama Kaori, Ogawa Kaoru	4. 巻 Volume 11
2. 論文標題 Synovial sarcoma of the maxillary sinus: an extremely rare case with excellent response to chemotherapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 OncoTargets and Therapy	6. 最初と最後の頁 483 ~ 488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/OTT.S151473	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	公田 龍一 (Kota Ryuichi) (00464834)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教 (32612)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	小池 直義 (Koike Naoyoshi) (60464913)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教 (32612)	